

骨髓单个核细胞移植治疗 2 型糖尿病小鼠急性心肌梗死的研究

杜娟, 柯亭羽, 雷川云, 牛学琴, 李孔龙

(昆明医科大学第二附属医院老年内分泌科, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 研究骨髓单个核细胞 (BMMNCs) 对 T2DM 小鼠心肌梗死的疗效. **方法** 小鼠分为 4 组: 正常小鼠注射盐水组 (NS 组), 正常小鼠注射细胞组 (NM 组), 糖尿病小鼠注射盐水组 (TM 组), 糖尿病小鼠注射细胞组 (TS 组). 取材后通过 HE、Masson's、vWF、Isolectin、WGA 免疫染色观察疗效. **结果** 正常组和糖尿病组细胞移植后 VEGF 表达水平相当, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 细胞组梗死面积较盐水组小, 胶原面积较盐水组的少, 血管密度较盐水组大, 心肌细胞肥大较盐水组轻, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). **结论** 骨髓单个核细胞对心肌损伤组织的修复、梗死边缘区细胞的肥大增生、血管新生方面有明显的改善作用.

[关键词] 骨髓单个核细胞移植; 2 型糖尿病; 急性心肌梗死

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 04-0001-05

Bone Marrow Mononuclear Cells Transplant for the Treatment of Acute Myocardial Infarction in Mice with Type 2 Diabetes Mellitus

DU Juan, KE Ting-yu, LEI Chuan-yun, NIU Xue-qin, LI Kong-long

(Dept. of Agedness Endocrinology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To study the curative effect of bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) on acute myocardial infarction in mice with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** Mice were divided into 4 groups: normal mice with saline injection, normal mice with cell injection, T2DM mice with saline injection, and T2DM mice with cell injection. The curative effect was observed through HE, Masson's, vWF, isolectin and WGA immunostaining after sampling. **Results** VEGF expression in T2DM group was similar in normal group after transplant, with no significant difference. The infarct and collagen size sizes in normal and T2DM groups after transplant were less than those in saline groups, blood vessel density was thicker than that in saline groups, cardiomyocyte hypertrophy was less severe than that in saline groups. The differences were statistical significance between cell transplant groups and saline groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The therapy of BMMNCs transplant has obvious improvement on the restoration of myocardial tissue damage, cell hypertrophy of the edge area of infarction and angiogenesis.

[Key words] Bone marrow mononuclear cell transplant; T2DM; Acute myocardial infarction

全球范围内糖尿病患者人数与日俱增, 发展中国家更为突出, 据统计, 到 2030 年, 这个群体的人数将从 2000 年的 1.71 亿增加到 3.66 亿^[1], 2

型糖尿病患者罹患心血管疾病的几率是非糖尿病人的 2~3 倍, 患糖尿病的男女性死于心血管疾病的人数较正常人死于心血管疾病数量高 1.5 倍以上

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31260223, 81260229); 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2012FB044)

[作者简介] 杜娟 (1964~), 女, 云南曲靖市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事内分泌临床工作.

[通讯作者] 柯亭羽. E-mail:ketingu@hotmail.com

临床缺血性心脏病主要并发于糖尿病和高血压这 2 种最常见的慢性病,但大多数研究使用的动物模型却没有这些与心脏病息息相关的基础疾病,而这些疾病能造成心脏结构、功能,甚至机体内环境的病理性变化。在这种前提下,研究建立了 2 型糖尿病小鼠急性心梗的模型,将同一种骨髓单个核细胞移植到正常小鼠和糖尿病小鼠梗死心脏内,观察研究同种干细胞在两种不同内环境下其对缺血心肌修复作用的差异。

1 材料与方法

1.1 实验动物与喂养

约 3~4 周龄离乳 C57BL/6J 小鼠,雌性,体重约 12~14 g, SPF 级,共 60 只,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK 示 2009-0004, NO: 0241022 (建立糖尿病模型)。使用普通的饲料喂养(中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供)。健康 C57BL/6J 小鼠,雄性,体重约 26~28 g (越肥越好),2 只, GFP+, 北京华阜康生物科技股份有限公司(提取 BMMNCs)。使用高热量食物喂养(北京华阜康生物科技股份有限公司提供)。小鼠饲养环境为天津市中国工程所的 SPF 级别的动物房,饮用水经过严格灭菌。室内湿度维持在 40%~70%,温度在 18℃~22℃,明暗时间比例为 2:1。

1.2 动物模型的建立

1.2.1 2 型糖尿病小鼠模型建立 健康断乳(约 3~4 周龄) C57BL/6J 小鼠,雌性,体重约 12~14 g, SPF 级,予以基础饲料适应性喂养 3 d,再高糖、高脂饲料喂养 8 周,最终诱导出胰岛素抵抗现象。第 9 周时,给予小剂量链脲佐菌素(streptozocin, STZ) (1% STZ, 85 mg/kg body weight 剂量)腹腔注射 1 次,间隔 3 d 后重复 1 次。观察动物体重变化、进食量、饮水量及尿量,出现明显“三多一少”症状,按照 1999 年 WHO 推荐的糖尿病诊断标准筛选为成功模型。

1.2.2 小鼠急性心肌梗死模型的制备 开胸定位左冠状动脉,用 3-0 缝合线将冠状动脉左前降支永久结扎。

1.3 BMMNCs 的提取

处死 GFP+ 雄性 C57BL/6J 小鼠 2 只,分离上下肢骨干,剥离肌肉,在加有 2 mL 培养基的灭菌研钵中轻压骨干至压碎,释放骨髓基质入培养基内获得。

1.4 动物分组

根据不同的实验目的将动物按照时间和注射材料及动物类型进行分组,具体分组如下:(1)正常小鼠冠状动脉左前降支永久结扎注射盐水组(normal saline, $n=4$, NS 组);(2)正常小鼠冠状动脉左前降支永久结扎注射细胞组(normal MNC, $n=4$, NM 组);(3)糖尿病小鼠冠状动脉左前降支永久结扎注射盐水组(T2DM saline, $n=5$, TM 组);(4)糖尿病小鼠冠状动脉左前降支永久结扎注射细胞组(T2DM MNC, $n=4$, TS 组)。

1.5 实验动物组织的取材

治疗 14 d 处死动物,剪掉整个心脏后剔除多余的肺脏及筋膜组织,再用盐水洗净心脏组织,脱水石蜡包埋,5 μm 切片。

1.6 观测指标

动物的一般情况,体重、饮水量、进食量、胰岛素水平。切片 HE 染色、Masson 染色、WGA 染色、Isolectin 染色、vWF 染色、GFP & α -actinin 双重染色。

1.7 统计学分析

GraphPad Prism 5.0, Image-Pro Plus 6.0, Primer Premier 5, Origin 8.0, Photoshop 7.0, 分析上述过程所照的照片中,计数统计结果用 SPSS 13.0 软件统计分析,结果以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。2 组间比较行配对 t 检验,而多组间比较行单因素方差分析(方差不齐时,采用 Dunnett's T3 校正;方差齐时,采用 Bonferroni 校正)。

2 结果

2.1 实验动物一般情况

2.1.1 一般情况 小鼠予高热量食物喂养,体重成异常生长趋势,喂养 8 周后大鼠已为成年鼠,体重增长较慢;实验小鼠在腹腔注射小剂量 STZ 7 d 后体重较前有所减轻,饮水量、进食量较前明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

2.1.2 胰岛素水平变化 小鼠在高热量食物喂养后胰岛素水平明显增加,出现胰岛素抵抗。腹腔注射小剂量 STZ 7 d 后胰岛素水平明显下降,与注射前比较差异有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

2.2 14 d 取材染色结果

2.2.1 HE、masson 染色 梗死心肌的 HE 染色,(图 1A)见染色稍浅的部位为梗死的心肌,正常红色的心肌纤维组织已不存在,取而代之的是如图 1-B masson 染色所示蓝色部位的胶原组织。梗死面积与心肌总面积的统计结果,从胶原面积结果看,

正常小鼠细胞组的胶原较盐水组的少, 显示细胞组比盐水组在组织修复方面更具有优势差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表3及图2.

2.2.2 vWF 血管染色 荧光为血管显像, 见图3. 不管是正常小鼠组还是糖尿病小鼠组, 细胞组的血管数量均多于盐水组, 显示了骨髓细胞移植入心脏后不仅成功的存活了下来, 在2周的时间内还促使心肌微血管增生, 给心肌提供营养, 帮助心功能的恢复. 其中正常小鼠盐水组与糖尿病小鼠细胞组之间的比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表4及图4.

2.3 Isolectin 血管染色

可清晰的看出在梗死区、梗死边缘区、非梗死区毛细血管的分布差异, 见图5 (200×). 正常小鼠植入细胞组血管增生情况比糖尿病小鼠植入细胞组少有优势, 同时盐水组中, 糖尿病组要比正常组稍差一些. 各组比较差异无统计学意义 ($P >$

0.05), 见表5及图6.

2.4 WGA 免疫染色

观察心肌梗死后梗死区边缘心肌的肥大情况. 见图7 (200×). 细胞组的梗死边缘区心肌细胞较盐水组边缘区细胞小, 说明移植的骨髓细胞分泌的各种因子较单纯的盐水在某种程度上抑制了炎症反应的发生, 而使该处的心肌细胞能到一定程度的恢复, 不至于发生更进一步的损害, 导致心功能不可逆的损害. 其中TM组与NS组和TS组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图8.

2.5 GFP&a-actinin 双染

移植干细胞后梗死周边区增殖的心肌细胞, 见图9. 心梗后周边区少量有分裂的心肌细胞会进入细胞周期, 干细胞移植显著增加了分裂相心肌细胞的数量, 盐水组中未发现这种心肌细胞. 2组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表6及图10.

表1 小鼠体重、饮水量及饮食量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The changes of weight, water intake and diet of mice ($\bar{x} \pm s$)

时 间	体重 (g)	饮水量 (g)	饮食量 (g)
2 周	18.063 ± 1.096	56 ± 4.156	39.33 ± 19.509
4 周	19.352 ± 1.399	51.33 ± 7.536	51.667 ± 34.158
6 周	20.998 ± 1.573	48 ± 4.786	59 ± 41.114
8 周	21.826 ± 2.170	61.667 ± 5.710	64.75 ± 42.591
STZ 7 d	21.289 ± 2.071	63.546 ± 8.104**	80.818 ± 17.639**

与 STZ 注射前比较, ** $P < 0.01$.

表2 小鼠胰岛素水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The variation of insulin in mice ($\bar{x} \pm s$)

小鼠组别	胰岛素值 ($\mu\text{U/mL}$)
高热量饮食前	12.63 ± 3.96
高热量饮食 8 周	26.25 ± 5.02**
STZ 7 d	5.66 ± 2.08 $\Delta\Delta$

与高热量饮食前比较, ** $P < 0.01$; 与高热量饮食 8 周比较, $\Delta\Delta P < 0.01$.

表3 细胞移植 14 d 的梗死范围及胶原含量 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The infarct size and collagen content 14 days later after transplant ($\bar{x} \pm s$)

组 别	梗死范围比值 (%)	胶原含量 (%)
NM 组	49.724 ± 7.221	13.112 ± 1.081
NS 组	54.671 ± 6.728*	16.354 ± 3.425*
TM 组	45.839 ± 5.932	16.064 ± 2.116
TS 组	49.117 ± 5.216 Δ	22.568 ± 4.631 Δ

与 NS 组比较, * $P < 0.05$; 与 TS 组比较, $\Delta P < 0.05$.

表4 vWF 染色血管计数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 The count of vWF vessel staining ($\bar{x} \pm s$)

组 别	微血管数 (个)
TM 组	11.86 ± 1.07
TS 组	9.13 ± 0.56
NM 组	13.17 ± 1.72
NS 组	9.04 ± 1.31*

与 NS 组比较, * $P < 0.05$.

表5 Isolectin 染色血管计数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 The count of isolectin vessel staining ($\bar{x} \pm s$)

组 别	Remote 区(个)	border 区(个)	infarction 区(个)
NM 组	451.17 ± 17.31	182.43 ± 8.59	78.36 ± 8.73
NS 组	428.46 ± 12.46	165.29 ± 10.52	71.95 ± 7.33
TM 组	387.13 ± 7.56	113.46 ± 7.34	61.75 ± 7.56
TS 组	352.31 ± 12.19	104.27 ± 8.73	56.29 ± 5.61

表 6 GFP&a-actinin 双染增殖细胞计数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 The proliferative cell count of GFP & a-actinin dual staining ($\bar{x} \pm s$)

组别	增殖的细胞(个)
TM组	21.15 ± 4.54
NM组	24.58 ± 6.49

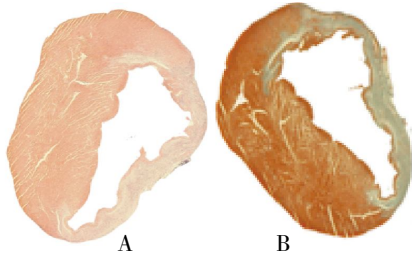


图 1 HE、masson 染色

Fig. 1 HE and masson staining

A:HE 染色 (50×); B:Masson 染色 (50×) .

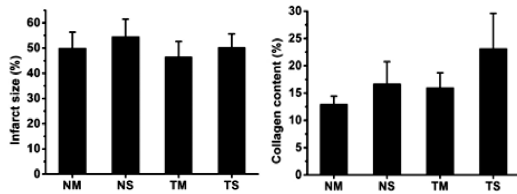


图 2 HE、masson 染色梗死范围及胶原含量

Fig. 2 The HE and masson staining infarct size and collagen content

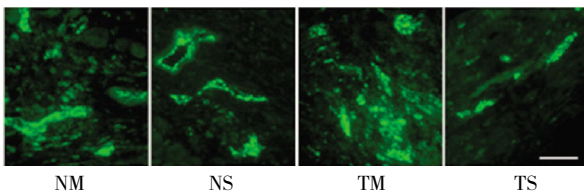


图 3 vWF 血管染色

Fig. 3 vWF vessel staining

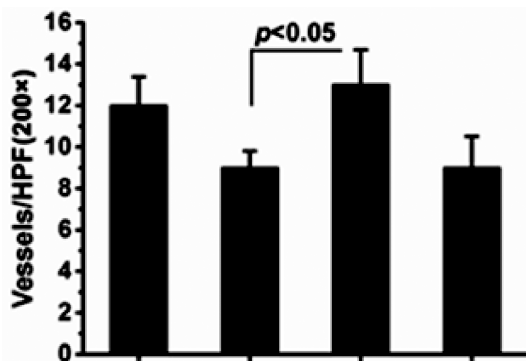


图 4 vWF 染色血管计数

Fig. 4 The count of vWF vessel staining

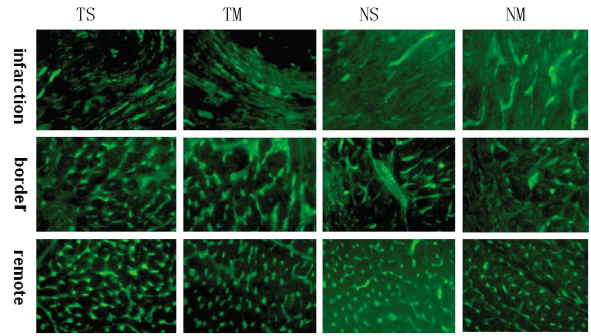


图 5 Isolectin 血管染色

Fig. 5 Isolectin vessel staining

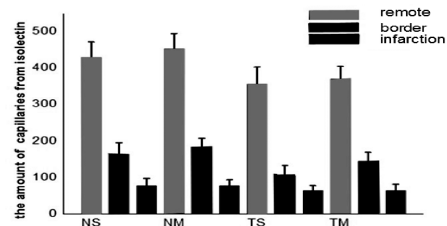


图 6 Isolectin 染色血管计数

Fig. 6 The count of isolectin vessel staining

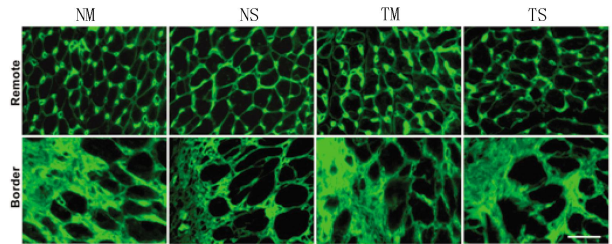


图 7 WGA 免疫染色

Fig. 7 WGA immunostaining

Diagram 4-A WGA immunostaining

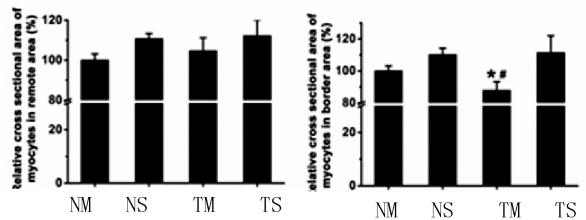


图 8 心肌肥大 WGA 免疫染色 (标尺 =50 μm)

Fig. 8 Myocardial hypertrophy WGA immunostaining (Scale=50 μm)

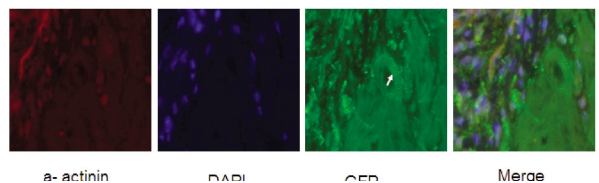


图 9 GFP&a-actinin 双染

Fig. 9 GFP & a-actinin dual staining

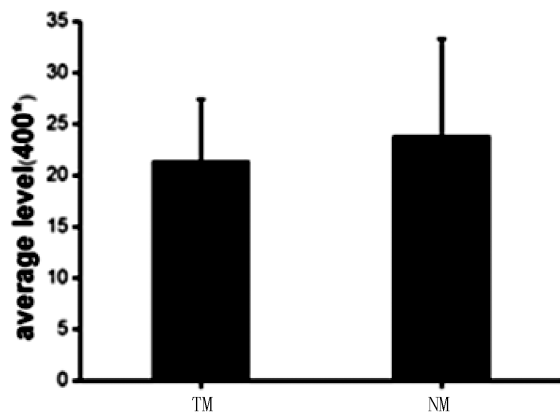


图10 GFP&a-actinin 双染增值细胞计数

Fig. 10 The proliferative cell count of GFP & a-actinin dual staining

3 讨论

2型糖尿病患者罹患心血管疾病的几率及死亡率很高^[2]。甚至在美国这样的发达城市,仍有65%的糖尿病患者死于心血管疾病。在糖尿病患者的体内,存在多种白细胞功能及白细胞介导的相关功能的损害,它们的吞噬功能没有明显减低,但对细菌杀伤吞噬能力显著下降,细胞毒性淋巴细胞攻击靶细胞的作用减弱,白细胞分泌速率下降。糖尿病控制不佳所导致的高脂血症造成细胞介导的免疫、增殖、吞噬以及细胞毒性作用的损害,最终影响细胞免疫功能。急性心肌梗死采用干细胞移植治疗的方式,许多动物实验研究都已表明:干细胞移植治疗心肌缺血性损伤,有一定的保护作用。已用于心肌梗死移植治疗的干细胞包括:胚胎干细胞,骨髓干细胞和骨骼肌干细胞等一些干细胞。骨髓单个核细胞包含了骨髓基质干细胞、造血干细胞、内皮祖细胞外加各种血细胞等在骨髓成分。除了内皮祖细胞,其他如造血干细胞、骨髓基质干细胞以及单核巨噬细胞及粒细胞的单核细胞也分泌了极其重要的各种因子,比如:血管内皮生长因子、干细胞因子、粒细胞集落刺激因子、内皮型一氧化氮合酶、白介素、肿瘤坏死因子、基质细胞衍生因子等。这些重要因子能促进内皮祖细胞分化、迁移,促进血管的新生。除此之外,造血干细胞也能促进血管新生。还有一点值得提出的是:骨髓干细胞基质中含有保证干细胞存活和分化的大量基质。骨髓间充质干细胞可分化为:软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞等多种成体细胞^[3-8],还能释

放促进血管新生的因子。缺血、缺氧的微环境中,组织能增加分泌、释放血管生长因子。生成新生血管除需要血管生长因子以外,内皮细胞还需要参与其中。骨髓单个核细胞包含的CD34细胞能分泌多种血管生长因子,因而在缺血的组织中能促进新生血管的生成。骨髓单个核细胞还可以显著增强损伤区的血管化;明显抑制心室重构,恢复梗死心肌后的心脏功能。本研究也观察到骨髓单个核细胞对缺血心肌有明显的改善作用,减轻缺血心室的心室重构。而骨髓单个核细胞具有以下几点优势:(1)容易从自体采集;(2)简单操作;(3)不存在免疫排斥反应。因此具有比较广阔的临床应用前景。

[参考文献]

- [1] SWILD, GROGLIC, AGREEN, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030[J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(2): 1 047 - 1 053.
- [2] NAKANISHI N, TAKATORIGE T, FUKUDA H, et al. Components of the metabolic syndrome as predictors of cardiovascular disease and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2004, 64(7): 59 - 70.
- [3] URBICH C, DIMMELER S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology [J]. *Circ Res*, 2004, 95(4): 343 - 353.
- [4] KAWAMOTO A, TKEBUCHAVA T, YAMAGUCHI J, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2003, 107(3): 461 - 468.
- [5] JUJO K, II M, LOSORDO D W. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45(4): 530 - 344.
- [6] ANVERSA P, PALACKAL T, SONNENBLICK E H, et al. Hypertensive cardiomyopathy. Myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian rat heart [J]. *J Clin Invest*, 1990, 85(4): 994 - 997.
- [7] BELTRAMI A P, URBANEK K, KAJSTURA J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction [J]. *The New England journal of medicine*, 2001, 344(23): 1 750 - 1 757.
- [8] SCHACHINGER V, ERBS S, ELSASSER A, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(3): 1 210 - 1 221.

(2015-02-27 收稿)